

Rhodopseudomonas spheroidesの暗呼吸に關与する チトクローム系

著者	本川 雄太郎
号	357
発行年	1966
URL	http://hdl.handle.net/10097/18184

氏 名 (本 籍) もと 本 かわ 川 ゆり 雄 た 太 ろう 郎

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 3 5 7 号

学位授与年月日 昭和 4 1 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専門課程 東北大学大学院医学研究科
(博士課程) 医化学専攻

学 位 論 文 題 目 Cytochrome Systems in Dark-aerobically
grown Rhodopseudomonas spheroides•
(Rhodopseudomonas spheroides の暗呼吸に関
与するチトクローム系)

(主 査)

論文審査委員 教授 菊 地 吾 郎 教授 吉 沢 善 作

教授 立 木 蔚

論 文 内 容 要 旨

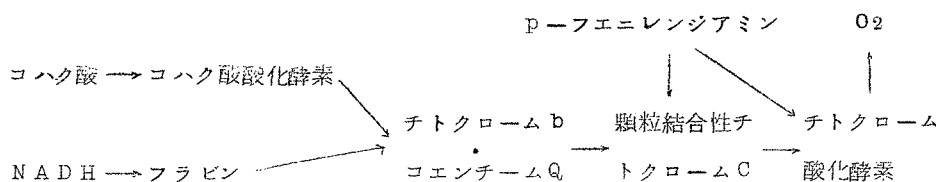
光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* や *Rhodopseudomonas spheroides* の好気暗条件に於ける末端酸化酵素は、従来所謂 *Rhodospirillum haem protein* (RHP) であると考えられて来た。しかし RHP は CO とは結合するが青酸とは結合しないと云う性質を持っており、これを本来の末端酸化酵素と考える事は矛盾がある。この疑問から出発して、菊地等は好気暗条件で培養した *R. spheroides* のチトクローム系を再検討し、その結果本菌の顆粒画分にはチトクローム酸化酵素活性を示す a 型チトクロームが存在する事を明らかにした。本論文は好気暗条件で培養した *R. spheroides* から a 型チトクロームを含む酵素標品を可溶性に抽出してその性質を追求し、a 型チトクロームが暗呼吸の末端酸化酵素である事を証明したものである。

好気暗条件培養の *R. spheroides* の菌体を超音波で破碎し $10000 \sim 77000 \times g$ で沈澱する顆粒画分を集め、これを Triton-X-100 を 2% 含む 0.25 M 蔗糖—0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 6.8) に浮游し—晩 4℃ で攪拌後 $105000 \times g$ で 1 時間遠心する。得られた上清にコール酸ソーダを 2% になる様に加え硫酸分画を行い、40% 硫酸飽和で浮游して来る画分を蒸留水に対して透析したものを酵素標品とした。この標品の可視部の吸収スペクトルには還元型では 603, 551, 522 並びに 418 $m\mu$ に吸収極大があり、560 及び 445 $m\mu$ に肩が認められた。即ち標品中には a 型と o 型チトクローム及び少量の b 型チトクロームが含まれている。標品のビリジンヘモクロームはヘム a 及びプロトヘムに特有の吸収を示した。一酸化炭素型引く還元型差吸収には、590 及び 430 $m\mu$ に極大が認められ、この a 型チトクロームは CO 結合能を持つ事が示された。この a 型チトクロームは哺乳動物の a + a₃ に類似のものである。一方 Kamen 等は最近 *R. rubrum* ではチトクローム o と呼ばれる b 型チトクロームが好気呼吸の末端酸化酵素であると報告しているので、次にこの菌にもチトクローム o があるかどうかを検討した。チトクローム o はアスコルビン酸と 2, 6—ジクロロフェノールインドフェノールを加えると還元されるが、普通のチトクローム b は還元されないと報告されているので、顆粒画分上記試薬を加え酸化還元差吸収を撮ると b 型チトクロームに相当する吸収は全然現われなかつた。この菌にはチトクローム o は存在しないと考えてよい。

酵素標品は牛の心筋チトクローム c や酵母のチトクローム c とよく反応し、その酸化を触媒した。至適 pH は前者に対しては 5.8、後者に対しては 6.3 であつた。この菌から得られる c

型のチトクローム 550 又は *R. rubrum* 明菌から得られるチトクローム α_2 の酸化に対する触媒能は低く、牛チトクローム α に対するものの $1/10$ であつた。チトクローム 550 酸化に対する至適 pH は 6.0 であつた。Km 値は馬心筋チトクローム α に対し 4.6×10^{-5} M, 酵母チトクローム α では 5.5×10^{-6} M, チトクローム α_2 では 3.4×10^{-5} M であつた。チトクローム α 酸化反応は KCN で阻害され、阻害率と KCN 濃度の関係は一次のシグモイドに一致し、50% 阻害を惹起する KCN 濃度は 1.2×10^{-6} M であつた。しかしながら α_2 に依る阻害は鼠肝ミトコンドリアと比較すると可成り軽度で、また基質が酵母チトクローム α の場合は馬心筋チトクローム α の場合より更に阻害率が低かつた。ミトコンドリアではこの様な基質に依る阻害率の差は認められない。酵素標品はまた P-フェニレンジアミンの空気酸化も触媒したが、チトクローム α を加えると酸素消費は 3~5 倍上昇した。チトクローム 550 やチトクローム α_2 は分光学的測定では反応性が低いにもかかわらず、P-フェニレンジアミンを基質にした反応系ではそれらの添加に依つて酸素消費が可成り著明に促進された。チトクローム 550 や α_2 の態度が反応系の構成に従つてこの様に相違する事の理由は現在のところ不明である。P-フェニレンジアミンの酸化も KCN で阻害され、阻害様式はチトクローム α 酸化の場合と同様であつた。また阻害の程度はチトクローム α 添加の有無によつて何ら影響されなかつた。

この菌の水溶性画分からはチトクローム 550 以外にチトクローム 553 と呼ばれる α 型チトクロームが発見されているが、これは種々の実験結果からみて暗呼吸系には関係は無いと判断された。また酸化酵素標品中にも顆粒結合性と考えられる α 型チトクロームが存在し、これは空気中では常に酸化型で存在するが、窒素気中又は KCN 存在下ではコハク酸と顆粒画分に依り還元された。この還元チトクローム α は空気中で再酸化されたが、KCN が在れば再酸化は起らなかった。酸化還元電位を赤血塩-黄血塩系で測定すると約 +0.25 V であつた。これ等の事実は顆粒結合性 α 型チトクロームが暗呼吸の電子伝達体である事を示すものと考えられる。一方チトクローム 550 の酸化還元電位は +0.34 V で、チトクローム α_2 に近い値であつた。チトクローム 550 は本来は好気呼吸には関係が無く、光酸化還元系に関係あるものと思われる。これ迄の結果から *R. sphaeroides* の暗呼吸系は次の様に考えられる。



審 査 結 果 の 要 旨

非硫黄光合成細菌の好気呼吸の末端酸化酵素は RHP であるとする従来の説に疑問を持った著者は新たな観点からこれを追求し、本菌の暗呼吸の末端酸化酵素は RHP ではなくて a 型チトクロームである事を証明している。著者は先ず酸化酵素標品を可溶化する事に成功したが、この標品及びこの標品のビリジンヘモクロームを分光学的に検索した結果、明らかにヘム a を持ったチトクロームの存在する事を認めた。この a 型チトクロームは哺乳動物の $a + a_3$ に類似のものであり、またこの菌には所謂チトクローム O は存在しないと考えてよい成績を得た。本菌の a 型チトクローム標品はチトクローム酸化酵素が示すべきすべての触媒活性を具えていたが、特に本酵素は CO による阻害を比較的受け難く、またその阻害の程度は用いたチトクローム C の種類によつてかなり大きな相違を示すという著しい特徴を持つ事が示された。著者は更に本酸化酵素標品中に結合している C 型チトクロームの反応性についても詳細な検討を行つて、その酸化還元電位が約 +0.25 V である事、コハク酸脱水素酵素系の電子伝達体となり得る事その他を明らかにした。それらの結果に基いて *R. sphaeroides* の暗呼吸系の構成は、脱水素酵素系 \rightarrow チトクローム b \cdot コエンチーム Q \rightarrow 顆粒結合性チトクローム O \rightarrow チトクローム酸化酵素 \rightarrow O_2 のようである事を確立した。本研究は呼吸系の進化及び比較生化学的な見地から大きな意義を持つものである。したがつて本論文は学位を授与するに値するものと認める。